

## 未熟児の腸内菌叢に関する研究

第1編 天然栄養の未熟児糞便における各種細菌  
の出現率

昭和37年10月31日 受付

信州大学医学部小児科学教室

(主任: 吉田 久教授)

藤 原 達 郎

Studies on the Intestinal Flora of Premature Infants  
fed Breast MilkPart I Distribution of Various Microorganisms found  
in Feces of Premature Infants fed Breast Milk

Tatsuro Fujihara

Department of Pediatrics, Faculty of Medicine,

Shinshu University

(Director: Prof. H. Yoshida)

## I 緒 言

未熟児と成熟児とは形態的のみならず、その機能においても多くの差がある。乳児の腸内菌叢が栄養方法、栄養状態などによつて異り乳児に種々の面で大きな影響を及ぼしていることも周知である。従つて未熟児の腸内菌叢につき各方面から検討を行うことは有意義と思われる。

未熟児は成熟児に比べ、下痢に罹患しやすいという<sup>①-④</sup>。又乳児の下痢罹患と腸内菌叢、就中 *L. bifidus* との関係はしばしば強調される所である<sup>⑤-⑨</sup>。よつて未熟児腸内菌叢の検討に当り、この点につき十分に検索するのは最も興味ある課題の一つと思われた。未熟児腸内菌叢中本菌を中心としては文献上数氏の報告<sup>⑩-⑬</sup>を見出したが、腸内菌叢全般につき出現率から精細な検索を行つた成績は見出しえなかつた。

未熟児の腸内菌叢の検討をなすに当り、著者は以上述べた所より、まづ、天然栄養の未熟児を対象として本菌を含む腸内の各種細菌の出現率を検索したので茲に報告する。

## II 検査材料及び検査方法

## 1) 検査材料

検査材料は、昭和32年2月より昭和36年12月迄に信州大学小児科に入院した天然栄養の未熟児15例(生下時体重2.5kg以下、生後11日~3ヶ月)より無菌的操作によつて採取した糞便である。健康な天然栄養の成

熟児12例(生下時体重3.0kg以上、月令2~6ヶ月)の糞便を同様に採取、予備実験に用いた。これらの乳児は何れも下痢、腸管外感染等特別の疾患に罹患してゐなかつた。

## 2) 検査方法

## i) 培養基及び培養方法

培養法としては、嫌気性及び好気性培養を用いた。何れも2%ブドウ糖加肝臓寒天(pH. 7.2~7.3)平板を用いた。嫌気性培養方法は、柳沢<sup>⑭</sup>の改良せるVarney法による黄磷嫌気性培養法を用いた。

## ii) 実施方法及び判定

滅菌生理食塩水10ccに糞便の1白金耳をとり充分攪拌し、10倍連続階段希釈した。そのうち10<sup>8</sup>並びに10<sup>4</sup>倍希釈したものの1白金耳をとり、培養基にコンラージ棒にて一様に塗布し、72時間嫌気性培養を行つた後取り出し培養基上の集落(約200~300)を対象とし形状、大きさ、色調、硬さ、透明度及び表面の模様を細かく観察して分類した。同一と認められた集落中より1箇所を鉤菌し、1部を再び培養基に塗布し、48時間好気性培養を行ない、偏性嫌気性と通性嫌気性とに区別し、グラム染色と単染色で形態的検査を行つた。同時に同定に必要な生物学的性状を検索して菌種を決定した。同定のため検索した生物学的性状の主なるものは次の如くである。Indol 反応, Methylred 反応, Voges-Proskauer 反応, クエン酸ソーダ培地発育試験, 硫化水素産生能, 尿素分解能, 各種糖分解能。これらの術式の細部は細菌学実習提要<sup>⑮</sup>に原則として準拠した。百分率をもつて出現率となし、その細菌叢の

構成を表わした。又各菌種毎にその平均値を求め、平均出現率とした。

III 予備実験

本法を用いて、未熟児の腸内菌叢の検索を行うに当たり、予め健康な天然栄養の成熟児12例の糞便を材料として、腸内菌叢の出現率を百分率より検索した。その結果を要約すれば第1表の如くであつた。即ち検索せる12例の何れにおいても偏性嫌気性菌は圧倒的に多く証明され(80.5~100%), 平均出現率は94.3%であつた。主体をなしたものは全例にみられた *L. bifidus* (74.1~99.5%) で平均出現率は90.0%を占め、3例に *Veillonella parvula* (6.1~21.3%, 平均3.3%), 1例にその他(分類不能)(12.1%, 平均1.0%)を証明した。之に反し通性嫌気性菌は10例に認められたが、全例はるかに低率(0.5~19.5%)で、平均出現率は5.7%であつた。その内訳は *Coliform bacilli* (8例, 0.5~3.3%, 平均1.0%), *Enterococci* (3例, 8.9~12.4%, 平均2.6%), *L. acidophilus* (2例, 2.6, 15.6%, 平均1.5%), その他(3例, 0.9~4.4%, 平均0.7%)であつた。

IV 検査成績

1) 未熟児の腸内菌叢出現率

天然栄養の未熟児15例の糞便につき、菌叢の百分率を検索した成績を症例別に一括すれば第2表の如くなつた。即ち偏性嫌気性菌は1例をのぞき全例に認められたが、対象により出現率の差が大きく(2.4~99.8%), 平均出現率は56.3%であつた。その主体をなしたものは、*L. bifidus* で13例(2.4~99.8%)に認め、平均

出現率は51.5%を占めた。又 *Veillonella parvula* は2例(21.8, 48.4%, 平均出現率4.7%)に、その他を1例(1.2%, 平均0.1%)に認めた。通性嫌気性菌の出現率も症例により差が大きかつたが(0.2~100.0%)全例に認め、平均出現率は43.7%であつた。これを偏性嫌気性菌の平均出現率と比べると、両者間に有意の差は認めなかつた(危険率5%, *t*検定)。又、その主体をなしたものは *Coliform bacilli* で12例(1.4~91.7%)に認め、平均出現率は35.5%を占めた。その他 *Enterococci* (5例, 0.6~49.2%, 平均4.4%), *L. acidophilus* (3例, 1.7~4.7%, 平均0.6%), *Staphylococcus* (4例, 5.0~12.6%, 平均2.1%), *Streptococcus* (1例, 1.2%, 平均0.1%), *Fungi* (2例, 0.2, 12.3%, 平均0.8%), その他(1例, 1.7%, 平均0.1%)を認めた。

2) 未熟児の腸内菌叢における *L. bifidus* 出現率と生下時体重、検査時体重及び月令

i) 生下時体重との関係

未熟児を生下時体重より2kg未満(6例, 1.79~1.99kg)と2kg以上(9例, 2.04~2.45kg)の2群に分け、それぞれの群における *L. bifidus* の出現率を比較した。前者では0~99.8%, 平均出現率31.8%, 後者では0~95.0%, 平均出現率64.7%となり、平均出現率において後者は高率であつた。しかし *t* 分布により推計学的検討を行つた(以下の推計学的検討は全て同じ)ところ有意の差は認めなかつた(危険率5%)。

ii) 検査時体重との関係

未熟児を検査(採便)時体重より3kg未満(7例,

第1表 天然栄養成熟児の腸内菌叢 (出現率, 嫌気性培養)

菌種名	通性嫌気性菌							偏性嫌気性菌					
	<i>Coliform bacilli</i>	<i>Enterococci</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Fungi</i>	其の他	通性嫌気性菌総計	<i>L. bifidus</i>	<i>Veillonella parvula</i>	<i>Eubacterium tortuosum</i>	其の他	偏性嫌気性菌総計
平均出現率 %	1.0	2.6	1.5	0	0	0	0.7	5.7	90.0	3.3	0	1.0	94.3
標準偏差	1.03	4.68	4.50	-	-	-	1.45	6.88	8.95	6.79	-	3.47	6.88

※ 分類不能

第2表

天然栄養未熟児の腸内菌叢  
(出現率, 嫌気性培養)

対 象	生 下 時 体 重 (kg)	性 別	月 令	検 査 時 体 重 (kg)	通 性 嫌 気 性 菌							偏 性 嫌 気 性 菌							
					Coliform bacilli	Enterococci	L. acidophilus	Staphylococcus	Streptococcus	Fungi	※ 其 他	通 性 嫌 気 性 菌 総 計	L. bifidus	Veillonella parvula	Eubacterium tortuosum	※ 其 他	偏 性 嫌 気 性 菌 総 計		
1	松○	2.260	男	1 20	3.220	32.9	0	4.7	0	1.2	0	0	0	38.8	61.2	0	0	0	61.2
2	磯○	2.130	女	15	2.045	72.3	0.6	0	0	0	0	0	0	72.9	27.1	0	0	0	27.1
3	磯○	1.790	女	15	1.604	91.7	0	0	0	0	0	0	0	91.7	7.1	0	0	1.2	8.3
4	丸○	2.450	男	2	4.790	7.8	9.6	0	0	0	0	0	0	17.4	82.6	0	0	0	82.6
5	青○	1.875	男	1 20	2.780	13.0	0	0	0	0	0	0	0	13.0	65.2	21.8	0	0	87.0
6	牧○	1.980	女	25	2.220	80.7	3.2	0	0	0	0	0	0	83.9	16.1	0	0	0	16.1
7	藤○	2.250	男	3	3.780	15.9	0	1.7	0	0	0	1.7	19.3	80.7	0	0	0	0	80.7
8	平○	2.100	男	13	2.100	50.8	49.2	0	0	0	0	0	0	100.0	0	0	0	0	0
9	鹿○	2.040	男	11	2.300	0	0	0	5.0	0	0	0	0	5.0	95.0	0	0	0	95.0
10	原○	2.240	男	13	2.270	0	0	3.1	7.7	0	0	0	0	10.8	89.2	0	0	0	89.2
11	吉○	1.960	男	2	4.100	91.1	0	0	6.5	0	0	0	0	97.6	2.4	0	0	0	2.4
12	細○	1.900	女	1 20	3.790	51.6	0	0	0	0	0	0	0	51.6	0	48.4	0	0	48.4
13	塚○	2.400	女	3	5.120	23.3	4.0	0	12.6	0	0	0	0	39.9	60.1	0	0	0	60.1
14	川○	2.450	男	2	3.100	1.4	0	0	0	0	12.3	0	0	13.7	86.3	0	0	0	86.3
15	新○	1.990	男	3	5.520	0	0	0	0	0	0.2	0	0	0.2	99.8	0	0	0	99.8
平均出現率 %						35.5	4.4	0.6	2.1	0.1	0.8	0.1	43.7	51.5	4.7	0	0.1	56.3	
標準偏差						34.74	12.66	1.43	3.95	0.31	3.17	0.44	36.40	38.33	13.33	0	0.31	36.40	

※ 分類不能

第3表 天然栄養未熟児の L. bifidus 出現率と  
生下時体重, 検査時体重及び月令

		平均出現率	標準偏差
生下時体重	2kg未滿	31.8	41.16
	2kg以上	64.7	31.95
検査時体重	3kg未滿	42.9	39.65
	3kg以上	59.1	38.04
検査時月令	1月未滿	39.1	42.09
	1月以上	59.8	33.80

1.60~2.78kg)と3kg以上(8例, 3.22~5.52kg)の2群に分け, 同様の比較をした。前者における L. bifidus 出現率は0~95.0%, 平均42.9%であり, 後

者では同じく0~99.8%, 平均59.1%となつた。即ち平均出現率は後者で高率であつた。しかし推計学的検討を行つたところ有意の差は認めなかつた。

iii) 検査時月令との関係

未熟児を検査時月令より1月未滿(6例, 11~25日)と1月以上(9例, 1月20日~3月)の2群に分け同様の比較をした。前者における L. bifidus 出現率は0~95.0%, 平均39.1%であり, 後者では同じく0~99.8%, 平均59.8%となつた。即ち, 平均出現率は後者で高率であつた。しかし推計学的検討を行つたところ有意の差は認めなかつた。

V 総括並びに考按

未熟児が形態的のみならず機能的にも成熟児と異なる

こと、乳児の腸内菌叢が栄養方法、栄養状態などにより著しく異り乳児につねに大きな影響を与えるとされることより、著者は未熟児腸内菌叢につき検索を加えその特殊性を明らかにするとともに、その意義を考察しようと考えた。第1階程として天然栄養の未熟児を対象として、乳児の腸内における細菌中臨床的意義の強調される *L. bifidus* を中心に腸内各種細菌の出現率を百分率より検討した。

手許の文献につき未熟児腸内菌叢中著者が本編に於て対象の一つとした *L. bifidus* に関するものをみると、何れも天然栄養児を対象として、Sengenhoff<sup>⑩</sup>はその過半数に *L. bifidus* の減少を認め、Seyfarth<sup>⑪</sup>は大腸菌が腸管上部へ増殖したものは *L. bifidus* が減少したと云い、Mayer<sup>⑫</sup>は幼若例において *L. bifidus* の劣勢なことを述べ、Hoffmann<sup>⑬</sup>は未熟児の菌叢は新鮮、煮沸人乳の何れで栄養される際も上記諸家と同様の傾向を示したという。しかし Braun<sup>⑭</sup>によれば Frisell<sup>⑮</sup>、Haenel<sup>⑯</sup>の成績に於て上記の所見は認められなかつたという。なお *L. bifidus* と共に存在する他種の菌についてみると Hoffmann は煮沸乳の場合に大腸菌などを多く証明したというが、他の報告では比較的簡単な記載に止つていた。

そこで著者は肝エキス培地を用い、嫌気性及び好気性培養を併用し、予め天然栄養の成熟児につき予備実験を十分に行つたのち、同じく天然栄養の未熟児につき各種細菌の出現率を可及的精しく知るべく検索を行つた。培地として肝エキスを用いた理由は、天然栄養児の腸内菌叢においては、*L. bifidus* をはじめとする乳酸菌属の観察が重要であり、この目的には近年種々の考案がされているが<sup>⑰-⑳</sup>、今回は各細菌の出現率の概略を知るのが主目的であつたので、Blaurock<sup>㉑</sup>の発表した本培地を用いることとした。嫌気性培養法として Varney-柳沢による黄燐法を用いたのは腸内細菌叢の検索手技として本法の卓越せることが諸家の成績によつて明らかとされていたによる<sup>㉒-㉓</sup>。予め行つた予備実験の結果、成熟児においては *L. bifidus* を主体とする偏性嫌気性菌の圧倒的優勢を実証し、本法が著者の研究目的に適することを知つた。

未熟児15例の糞便を材料とし、腸内菌叢を本法によつて検索した結果、各個体により出現率は相当著しい動揺を示した。偏性嫌気性菌と通性嫌気性菌に大別し、両者につき平均出現率を比較すれば、それぞれ  $56.3\% \pm 36.4$  ( $\sigma$ )、 $43.7\% \pm 36.4$  で両者間に著しい差は認めず、推計学的にも有意の差はえなかつた。又それぞれにつき最も多く見られた菌種は、偏性嫌気

性菌では *L. bifidus*、通性嫌気性菌では Coliform bacilli であつた。このうち後者では Enterococci などのほか、少数乍ら Staphylococcus, Streptococcus を証明したことは、予備実験として行つた成熟児の場合に後二者を証明しえなかつたことから注目された。以上を要約すれば、対象の月令に差はあつたが、予備実験で得た成熟天然栄養児の成績をバランスのとれた状態とすれば、これらの未熟児の腸内菌叢は対象とした各個体における差の一般に大きかつたこと、偏性嫌気性菌と通性嫌気性菌の出現率に著しい差を認めなかつたこと、並びに成熟児には認めなかつたものを認めたことより、等しく天然栄養なるにも係らずアンバランスの状態にあると考えられよう。

そこで著者はさらに未熟児間において生下時体重、検査時体重検査時月令を指標とし、天然栄養乳児で特に意義が大きいとされる *L. bifidus* につき、このアンバランスの状態を比較した。その結果何れの場合も推計学的には有意差はえなかつたが、生下時体重の少かつたもの、検査時体重の少かつたもの、検査時月令の若かつたもの、本菌出現率はいづれも他の群に比べ低率であつた。即ち、等しく未熟児においても幼若例に上述したアンバランスの状態の著しい傾向がみられた。

如何なる理由によつて未熟児は、たとえ天然栄養で哺育した場合においても、腸内菌叢に上述の所見を呈し、かつ体重では月令の少い例に、この傾向が著しいかは興味ある課題と思われる。その細部についてはさらに詳細な検索にまたねばならないが、消化管よりの各種分泌液、就中酵素、pH あるいは Lysozym などにおける未熟児の特異性が考慮されるべきであろう。又、このような所見を呈したことの示す意義は、腸内菌叢が乳児に及ぼす影響についての従来諸知見<sup>㉔-㉕</sup>に徴し、未熟児の広義の機能と結んで注目すべきであろう。就中未熟児の下痢易罹患性に就てみると *L. bifidus* の出現が低率であつたことは、本菌が他の有害細菌に対して持つ拮抗作用<sup>㉖-㉗</sup>、殊に乳児下痢症の発生と重症化の1重要因子とされる大腸菌に対する拮抗作用<sup>㉘-㉙</sup>からみて互に関連して説明しやすいように思われる。この際同時にこれらの菌以外の各種細菌も当然関連し、それぞれの出現状況も問題とされるべきであろう。このことは、煮沸人乳で栄養した未熟児には対照とした新鮮人乳栄養児に比べ、消化不良症と病原大腸菌感染の多発をみたが、*L. bifidus* には差を認めなかつたとの Hoffmann<sup>⑬</sup>らの報告、あるいは乳児期の下痢発生準備素因としての腸内菌叢全般におけるアンバランスの意義を述べた諸橋<sup>㉚</sup>の

見解などによっても裏付けられよう。

## VI 結 語

嫌気性培養 (Varney-柳沢法) を用い、天然栄養成熟児の糞便を材料として、腸内菌叢を細菌の出現率から検索せるに偏性嫌気性菌は圧倒的に多く、その主なものは *L. bifidus* であり、通性嫌気性菌は著しく少かつた (平均出現率: 各94.3%, 90.0%, 5.7%)。

本法により天然栄養の未熟児15例の腸内菌叢を検査し、次の結果をえた。

1) 偏性嫌気性菌と通性嫌気性菌につき平均出現率をみると、それぞれ56.3%と43.7%で両者の間に著しい差はなかつた。又何れの場合も各個体における出現率には大きな差を認めた。

2) 偏性嫌気性菌中最も多く認めたのは *L. bifidus* (平均出現率51.5%) で、通性嫌気性菌中最も多く認めたのは *Coliform bacilli* (同35.5%) であつた。少数には *Staphylococcus*, *Streptococcus* なども認めた。

3) *L. bifidus* の出現率と未熟児の生下時体重、検査時体重、月令との関係を検討し、出現率は体重又は月令の少いものに低い傾向を認めた。

稿を終るに臨み御指導と御校閲を賜つた吉田教授、諸橋助教授並びに種々御教示頂いた本学細菌学教室田崎教授に深謝致します。

本論文の要旨は第121回日本小児科学会東京地方会 (昭和35年1月) において発表した。

## 文 献

- ①Levine, S. Z.: Mitchell-Nelson, Textbook of Ped. 359, Saunders, 1951. ②Goebel, F.: Rominger, Lehrbuch d. Kinderheilk. 354, Springer, 1950. ③Ylppö, A.: Fanconi, Lehrbuch d. Pädiatrie, 237, Benno-Schwabe 1956. ④高井俊夫: 未熟児 (医学シンポジウム第16輯), 336, 診断と治療社, 昭32. ⑤Adam, A.: Jb. Kinderheilk. 110: 186, 1925. ⑥Stransky, E. et al: Z. Kinderheilk. 43: 717, 1927. ⑦Reichelt, E.: Mschr. Kinderheilk. 63: 138, 1935. ⑧Bessau, G.: Ref. Med. Wschr. 84: 712, 1937. ⑨詫摩武人: 児科雑誌, 47: 1071, 昭16. ⑩Sengenhoff, A.: Mschr. Kinderheilk. 40: 263, 1928. ⑪Seyffarth, S.: Ibid. 52: 73, 1932. ⑫Mayer, J. B.: Erg. inn. Med. Kinderheilk. N. F. 7: 429, 1956. ⑬Hofmann, K. et al: Z. Kinderheilk. 81: 367, 1958. ⑭Braun, O. H.: Physiolog. Entwicklung des Kin-

des (F. Linneweh), 290, Springer, 1959.

- ⑮Frisell, E.: Acta paediat. (Uppsala) Suppl. 80: 1951. cit. ⑯. ⑰Haenel, H. et al: Arch. Kinderheilk. 157: 226, 1958. cit. ⑱. ⑲柳沢利喜雄・他: 千葉医誌, 11: 1002, 昭8. ⑳細菌学実習提要 (伝染病研究所学友会編), 丸善, 昭34. ㉑Gallenberg, H. et al: Acta Path. Microb. Scand. 42: 380, 1958. ㉒Hardley F.: 本間道, 日児誌, 57: 918, 昭28より引用. ㉓Rogosa, M. et al: J. Bact. 62: 132, 1951. ㉔Tomarelli, R. M. et al: J. Biol. Chem. 181: 897, 1949. ㉕Norris, R. E. et al: J. Bact. 60: 681, 1950. ㉖Hassinen, J. B.: J. Bact. 62: 971, 1951. ㉗Blaurock, G.: Mschr. Kinderheilk. 68: 304, 1937. ㉘村田文也: 日児誌, 58: 298, 昭29. ㉙勝又俊太郎: 日児誌, 58: 893, 昭29. ㉚高橋恒夫: 日児誌, 59: 783, 昭30. ㉛Liebscher, S.: Z. Kinderheilk. 85: 265, 1961. ㉜Thurau, R.: Mschr. Kinderheilk. 103: 176, 1955. ㉝諸橋健雄・他: 小児科臨床, 13: 363, 昭35. ㉞野竿賛治: 国民衛生, 1: 8, 大13. ㉟直宮勝美: 千葉医誌, 15: 2545, 昭12. ㊱中尾 信: 日児誌, 56: 71, 昭27. ㊲岩井千之: 日本細菌学雑誌, 475: 641, 昭10. ㊳矢吹晉一: 日児誌, 58: 871, 昭29. ㊴諸橋健雄・他: 小児科診療, 21: 1377, 昭33. ㊵諸橋健雄・他: 小児科臨床, 9: 385, 昭31. ㊶諸橋健雄・他: 小児科臨床, 11: 310, 昭33.

## ABSTRACT

Percentages of various microorganisms found in feces of premature infants fed breast milk were examined after preliminary examinations in those of matured breast-fed infants.

The unbalance of flora mainly due to the decrease of *L. bifidus* and the increase of coliform bacilli, staphylococcus and streptococcus was proved in premature infants.

The lower their birth weight, body weight examined and age of month was encountered, the more striking tendency of unbalance of flora was observed.